

Evaluation of novel therapeutic targets and diagnostic tools for atherosclerotic plaque progression : immunosuppression and proteomics

Citation for published version (APA):

Donners, M. M. P. C. (2005). *Evaluation of novel therapeutic targets and diagnostic tools for atherosclerotic plaque progression : immunosuppression and proteomics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20050304md>

Document status and date:

Published: 01/01/2005

DOI:

[10.26481/dis.20050304md](https://doi.org/10.26481/dis.20050304md)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

► Summary

Atherosclerosis is a complex, progressive disease of the large arteries and the leading cause of death in Western society. Although the build-up of lipids, cells and extracellular matrix can cause severe stenosis of the artery, most clinical complications (i.e. myocardial infarction or stroke) occur due to acute rupture of a plaque and thrombus formation. Despite extensive research, the underlying molecular mechanism of atherosclerotic plaque development and progression are still not completely clarified. Nevertheless, it is now generally accepted that atherosclerosis involves a chronic inflammatory disease as a response to oxidized lipids. We therefore hypothesized that the immunosuppressive drug FK506 (tacrolimus) would attenuate atherosclerotic plaque development. Besides the evaluation of the therapeutic potential of FK506, we also described the search for new therapeutic targets or diagnostic tools for atherosclerotic plaque rupture using proteomic analysis.

Recent advances in atherosclerotic and (transplant) arteriosclerotic research are described in *chapter 2*. These include quantitative trait locus (QTL) analysis, which is a 'reverse-genomics' approach correlating phenotype and genotype to identify genes that modify complex disease development. *In vivo* models of atherosclerosis and transplant arteriosclerosis increasingly use more complex interventions, such as bone marrow transplantation and double knockout mice, to unravel the molecular mechanisms and the contribution of distinct cell types to the development of these diseases. Although several *in vivo* models exist that display some features of atherosclerotic plaque instability, the search for animal models of true plaque rupture perseveres. Most likely, this will require multiple interventions or larger animals that more closely resemble humans.

In *chapters 3* and *4* we investigated the effect of a low dose of the immunosuppressive drug FK506 on the development and progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. In *chapter 3*, we used a mouse model in which atherosclerotic plaque development was accelerated by collar placement around the common carotid artery and using an atherogenic diet. Low dose FK506 (0.05 mg/kg/day) attenuated atherosclerotic plaque development, but also significantly inhibited the progression of previously developed plaques. Furthermore, low dose FK506 induced a more stable plaque phenotype by increasing plaque cell density and collagen content, while reducing necrotic core content of the plaques.

In *chapter 4* we used the conventional ApoE^{-/-} mouse model in which atherosclerosis develops spontaneously, even when using a normal diet. As in the model of accelerated, collar-induced atherosclerosis, low dose FK506 also inhibited spontaneous atherosclerotic plaque development and progression. Low dose FK506 increased alpha-smooth muscle actin-positive smooth muscle cell content and reduced T cell content of initial lesions in the left subclavian artery and brachiocephalic trunk, respectively. Although these effects on

lesion morphology were less evident than in the model of accelerated atherosclerosis, this again indicated an increase in plaque stability after treatment with low dose FK506.

Restenosis is the process of luminal narrowing after an intra-arterial intervention and, like atherosclerosis, this process also involves an inflammatory reaction. In *chapter 5* we tested the hypothesis that low dose FK506 would also inhibit restenosis-related processes (i.e. neointima formation and vascular remodelling) in the mouse model of carotid artery ligation. We found little effect on neointima formation, which was reduced after FK506-treatment but only in the area near the ligation. However, low dose FK506 affected arterial remodelling by an increase in lumen size and medial area.

The underlying molecular mechanism of atherosclerotic plaque rupture is far from elucidated, despite several gene expression studies that have been performed. *Chapter 6* describes the study of differential protein expression of human thrombus-containing plaques (i.e. plaques with intraplaque hemorrhage, plaque erosion or ruptured plaques) compared to stable plaques using 2D gel electrophoresis. This proteomics technique proved to be a sensitive and reproducible technique, although protein identification was difficult when using complex samples such as whole-mount atherosclerotic plaques in combination with broad pH-ranges (pH 4-7). Analysis of differential 2D spots revealed multiple proteins in a single spot, including vinexin- β and alpha-1 antitrypsin in a spot uniquely expressed in plaques with a thrombus. Although this is the first report of vinexin- β expression in atherosclerotic plaques, the differential expression of this protein appeared to be false-positive, since expression levels (as determined by Western Blotting) in stable plaques and thrombus-containing plaques were comparable. Differential expression of alpha-1 antitrypsin was confirmed by Western blotting of the 2D gels. We found 6 isoforms of alpha-1 antitrypsin to be expressed in advanced atherosclerotic plaques, one of which was uniquely expressed in plaques with a thrombus. Thus, this study showed that 2D gel electrophoresis is a powerful separation technique for differential-display proteomics, especially for resolving post-translational modifications, although validation of the results is required.

Chapter 7 describes a preliminary study to evaluate Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) as a new diagnostic tool for atherosclerotic plaque rupture. Comparison of serum proteomic profiles revealed eight peaks that could significantly discriminate patients with a stable plaque with those containing a lesion with a thrombus. This study shows that SELDI-TOF MS is a promising high-throughput technique and could serve as a diagnostic tool to find new biomarkers for atherosclerotic plaque rupture.

In *chapter 8* the findings of this thesis are discussed. In the first part, we evaluated the therapeutic potential of low dose FK506, and anti-inflammatory therapy in general, in vascular pathologies. In the second part we discussed the value of proteomic analysis to

identify new therapeutic targets and diagnostic tools for human atherosclerotic plaque rupture.

From the studies described in this thesis we conclude that low dose FK506 minimally affects neointima formation after carotid artery ligation, whereas it significantly inhibits atherosclerotic plaque development and progression, accompanied by increased features of plaque stability. Furthermore, 2D gel electrophoresis is a powerful separation technique for differential display analysis of atherosclerotic plaques, especially for post-translational modification, although identification of differential expressed proteins is difficult when using complex samples, such as whole-mount plaques. SELDI-TOF MS is a high-throughput technique to compare serum proteomic profiles that can discriminate patients with ruptured atherosclerotic plaques from those with stable lesions, which could serve as a diagnostic tool in the future.

► Samenvatting

Atherosclerose (aderverkalking) is een complexe en multifactoriële ziekte van de slagaders en doodsoorzaak nummer 1 in de Westerse wereld. Ophoping van vet en ontstekingscellen in de vaatwand (ontwikkeling van de zogenaamde plaque) veroorzaken een chronische ontstekingsreactie en zo het dichtslibben van de slagaders. De meeste klinische complicaties, zoals het hartinfarct of een beroerte, ontstaan echter door het openbarsten van zo'n plaque (ruptuur). Het precieze mechanisme van zo'n plaque ruptuur is nog steeds niet bekend, hoewel ontsteking een belangrijke rol speelt.

In dit proefschrift wordt het effect van het onderdrukken van het ontstekingsproces door middel van het immunsuppressivum FK506 (tacrolimus) op de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd. Daarnaast wordt het mechanisme van plaque ruptuur onderzocht door verschillen in aanwezigheid (expressie) van eiwitten in de laatste twee stadia van atherosclerose te vergelijken met behulp van zogenaamde proteomics technieken.

De laatste nieuwe ontwikkelingen op het gebied van atherosclerose onderzoek worden beschreven in *hoofdstuk 2*. Hiertoe behoort de QTL (quantitative trait locus) analyse techniek waarbij genotype en phenotype aan elkaar worden gecorreleerd om zo genen te vinden die de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloeden. In vivo modellen voor atherosclerose maken meer en meer gebruik van complexe interventies, zoals beenmergtransplantatie en knockout muizen, om het ziekte-mechanisme te ontrafelen. Hoewel er diersmodellen zijn die kenmerken vertonen van plaque instabiliteit, is men nog steeds op zoek naar een in vivo model voor een echt plaque ruptuur.

In *hoofdstuk 3 en 4* hebben we het effect van een lage dosis van het immunsuppressivum FK506 op de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd in ApoE-deficiënte muizen. In hoofdstuk 3 hebben we de ontwikkeling van atherosclerose versneld door een collar om beide carotiden van de muizen te plaatsen en de muizen een vetrijk dieet te voeren. Behandeling met een lage dosis FK506 (0.05 mg/kg/day) verminderde de ontwikkeling van atherosclerose en remde de progressie van bestaande plaques. Daarnaast leidde de FK506-behandeling tot meer stabiele plaques.

Hoofdstuk 4 beschrijft het effect van behandeling met dezelfde lage dosis FK506 op de spontane ontwikkeling van atherosclerose in de Apo^{-/-} muizen op een normaal dieet. Ook in dit model remde de FK506-behandeling de ontwikkeling van atherosclerose en waren er tekenen van verhoogde plaque stabiliteit.

Restenose is het proces van vaatvernauwing dat vaak optreedt na dotteren. Net als atherosclerose spelen ontstekingsreacties een belangrijke rol in de ontwikkeling van restenose. In *hoofdstuk 5* onderzochten we het effect van behandeling met de lage dosis FK506 op de onderliggende processen van restenose: de vorming van een neointima (groei van gladde spiercellen) en remodelering van de vaatwand (het krimpen van het

vat). Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van een muizenmodel, waarbij de arteria carotis wordt afgebonden. De FK506-behandeling had weinig effect op de neointima vorming, hoewel dit dicht bij de ligatie wel verminderd was. FK506 had wel een gunstig effect op vaatwandremodelleren, wat tot uiting kwam in een groter lumen en een dikkere media.

Hoewel er al veel studies gedaan zijn naar het ontstaan van een plaque ruptuur, is het onderliggende mechanisme dat tot deze klinische complicatie leidt nog verre van bekend. In *hoofdstuk 6* hebben we de verschillen in eiwitexpressie bestudeerd tussen vergevorderde, maar stabiele plaques en plaques met een thrombus (geruptureerde plaques en lesies met intra-plaque bloeding) afkomstig van patiënten. Dit hebben we gedaan met behulp van 2D gel elektroforese, een techniek waarmee de eiwitten uit de plaques op grootte en lading gescheiden worden. Hoewel we hebben aangetoond dat dit een gevoelige en reproduceerbare techniek is, bleek de identificatie van de eiwitten moeilijk met name door de complexe samenstelling van de plaques en het gebruik van brede pH-ranges voor de eiwitscheiding. Er werden meerdere eiwitten in eenzelfde 2D spot gevonden, waaronder alpha-1 antitrypsine en vinexine- β . Deze 2 eiwitten komen alleen tot expressie in plaques met een thrombus. Dit is de eerste studie die vinexine- β expressie beschrijft in vergevorderde atherosclerotische plaques, hoewel het verschil in expressie tussen de 2 plaque stadia vals-positief bleek te zijn. Het verschil in expressie van alpha-1 antitrypsine in deze laatste stadia van atherosclerose werd nog extra bevestigd met behulp van Western Blots van de 2D gels. Hierbij vonden we expressie van 6 vormen van alpha-1 antitrypsine in vergevorderde atherosclerose, waarvan 1 vorm alleen voorkwam in plaques met een thrombus. Uit deze studie concluderen we dat 2D gel elektroforese een goede techniek is om verschillen in eiwitexpressie, en met name post-translationele modificaties, in atherosclerose te bestuderen. Echter het valideren van de resultaten blijft zeer belangrijk. De verschillen in eiwitexpressie kunnen verder inzicht geven in het mechanisme van atherosclerotische plaque ontwikkeling en plaque ruptuur.

Hoofdstuk 7 beschrijft een eerste evaluatie van de Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-flight massa spectrometrie (SELDI-TOF MS) techniek als new diagnositsch middel om atherosclerotische plaque ruptuur op te sporen in het serum van patiënten. Serum profielen van patiënten met een stabiele plaque werden vergeleken met dat van patiënten met een plaque met een thrombus, waarbij 8 pieken werden gevonden die onderscheid konden maken tussen de beide patiënten-groepen. Deze eerste evaluatie liet zien dat SELDI-TOF MS een snelle techniek is voor het opsporen van plaque rupturen in het serum van patiënten en die mogelijk zal leiden tot het vinden van nieuwe markers voor plaque ruptuur.

In *hoofdstuk 8* worden de bevindingen van dit proefschrift in een breder perspectief geplaatst en bediscussieerd. Het eerste deel evalueert de behandeling met een lage dosis FK506 en andere ontstekingsremmende middelen als mogelijke therapie voor atherosclerose en andere vaataandoeningen. In het tweede deel wordt de waarde van het

bestuderen van eiwitexpressie met behulp van verschillende 'proteomics' technieken besproken om nieuwe therapeutische en diagnostische middelen te vinden voor atherosclerotisch plaque ruptuur.

Uit de studies beschreven in dit proefschrift concluderen we dat behandeling met een lage dosis weinig effect heeft op de neointima vorming na carotis ligatie, maar succesvol is in het remmen van de groei en ontwikkeling van atherosclerotische plaques en leidt tot meer stabiele lesies. Daarnaast hebben we laten zien dat 2D gel electroforese een goede techniek is om verschillen in eiwitexpressie tussen de verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen. Met name post-translationele modificaties van eiwitten kunnen met deze techniek goed in beeld gebracht worden. Identificatie van eiwitten uit complexe eiwit-mengsels blijft echter moeilijk. SELDI-TOF MS is een snelle techniek, dat als diagnostisch middel gebruikt zou kunnen worden om eiwit-profielen in het serum van patiënten te vergelijken om zo een plaque ruptuur op te sporen.